

- 16) Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, Phan TG, Tomaru T, Kamijo S, Sato T, Yagyu F, Mueller WEG, Ushijima H. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 44:3784-3786, 2006.
- 17) Phan TG, Khamrin P, Quang TD, Dey SK, Yagyu F, Okitsu S, Nishio O, Ushijima H. Genetic characterization of group A rotavirus strains circulating among children with acute gastroenteritis in Japan in 2004-2005. *Infect Gene Evol* 7: 347-253, 2007.
- 18) Phan TG, Trinh QD, Kaneshi K, Ueda Y, Nakaya S, Nishimura S, Sugita K, Nishimura T, Yamamoto A, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of new variant rotavirus G3 among infants and children with acute gastroenteritis in Japan during 2003-2004. *Clin Lab* 53: 41-48, 2007.
- 19) Maneekarn N, Khamrin P, Chan-it W, Peerakome S, Sukchai S, Pringprao K, Ushijima H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand provides evidence for the origin of VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. *J Clin Microbiol* 44:4113-4119, 2006.
- 20) Shimizu H, Phan TG, Nishimura S, Okitsu S, Maneekarn N, Ushijima H. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru city, Japan. *Infect, Genet and Evol* 7:247-253, 2007
- 21) Phan TG, Trinh QD, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Emergence of rare sapovirus genotype among infants and children with acute gastroenteritis in Japan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 26: 21-27, 2007.
- 22) Khamrin P, Maneekarn N, Peerakome S, Chan-It W, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Novel porcine rotavirus of the genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology* 2007 (E-pub).
- 23) Fujita S, Eguchi A, Okabe J, Harada A, Sasaki K, Ogiwara N, Inoue Y, Ito T, Matsuda H, Kataoka K, Kato A, Hasegawa M, Nakanishi M. Sendai virus-mediated gene delivery into hepatocytes via isolated hepatic perfusion. *Biol Pharm Bull* 29:1728-1734, 2006.
- 24) Goto, T., M. Morishita, K. Nishimura, M. Nakanishi, A. Kato, J. Ehara, K. Takayama. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes *Pharm Res* 23:384-391, 2006.
- 25) Zhou Y, Ushijima H, Frey TK. Genomic analyses of diverse rubella virus genotypes. *J Gen Virol* 88:932-941, 2007.
- 26) Wang XT, Liu PY, Tang JB, Mizutani H, Xin KQ, Ozawa K, Ushijima H. Tendon healing in vitro: Adeno-associated virus-2 effectively transduces intrasynovial

tenocytes with persistent expression, but other serotypes do not. *Hand/Peripheral Nerve Plastic Reconstructive surgery*. 119:227-234, 2007.

27) Nagai T, Okafuji T, Miyazaki C, Ito Y, Kamada M, Kumagai T, Yuri K, Sakiyama H, Miyata A, Ihara T, Ochiai H, Shimomura K, Suzuki E, Torigoe S, Igarashi M, Kase T, Okuno Y, Nakayama T. A comparative study of the incidence of aseptic meningitis in symptomatic natural mumps patients and monovalent mumps vaccine recipients in Japan. *Vaccine* in press

28) Fujino M, Yoshida N, Kimura K, Zhou J, Motegi Y, Komase K, Nakayama T. Development of a new neutralization test for measles virus. *J Virol Meth* in press

29) Terao Y, Takagi H, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. Identification of IgA against coronavirus in breast milk. *Clin Lab*, in press.

30) Makita K, Hayakawa Y, Okame M, Homma K, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H. First detection of IgA against Norovirus in breast milk. *Clin Lab* in press.

31) Dieng H, Boots M, Tamori N, Satho T, Higashihara J, Okada T, Kato K, Komalamisra N, Ushijima H, Takasaki T, Kurane I, Eshita Y. Effect of food, embryo density and conspecific immatures on hatchability in the dengue vector *Aedes albopictus*. *House household insect pest* in press.

32) Dieng H, Boots M, Higashihara J, Satho T, Kato K, Okada T, Komalammisra N, Ushijima H, Takahashi T, Kurane I, Eshita Y. Two dimensional gel analysis of midgut proteins of the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera Culicidae) with reference to sex and Bbody size. *Jpn J Environ Entemol Zool* in press.

33) Nguyen TA, Yagyu F, Okame M, Phan TG, Yan H, Hoang PL, Cao Anh TH, Hoang KT, Okitsu S, Ushijima H. Diversity of viruses associated with acute gastroenteritis in children hospitalized with diarrhea in Ho Chi Minh city, Vietnam. *J Med Virol* in press.

34) Trinh QT, Nguyen TA, Phan TG, Khamrin P, Yan H, Hoang PL, Maneekarn N, Yagyu F, Okitsu S, Ushijima H. Amino acid substitution in VP7 sequences of human rotavirus G1 isolated in Japan, China, Thailand, and Vietnam in 2002-2003. *J Med Virol* in press.

35) Ushijima H. Foreword. *Mother and child health in Asia and Africa*. *Pediatr Int* in press.

36) Li Y, Hotta M, Shi A, Li Z, Yin J, Guo G, Kawata K, Ushijima H. Malnutrition Improvement for Infants and Young Children under 18 months old of Dai Minority in Luxi, China. *Pediatr Int* in press.

- 37) Kominami M, Kawata K, Ali M, Meena H, Ushijima H. Factors determining prenatal HIV testing for PMTCT in Dar Es Salaam, Tanzania. *Pediatrics International* in press.
- 38) Nguyen TH, Ushijima H. Nutritional status of low birth weight ethnic minority infants in Backan province, Vietnam. *Pediatr Int* in press.
- 39) Hotta M, Ali M, Ushijima H, Lee S, Nakamura Y, Shigeta M, Kobayashi N. Situational analysis of maternal and child health services for foreign residents in Japan. *Pediatr Int* in press.
- 40) Li L, Li K, Ushijima H. Moderate- to -vigorous physical activity and body fatness in Chinese urban school children. *Pediatr Int* in press.
- 41) Manilay P, Ali M, Yagyu F, Soulivanh P, Kuroiwa C, Ushijima H. Risk factors for protein-energy malnutrition of children under 5 years: A study from Luangprabang province, Lao PDR. *Pediatr Int* in press.

風疹ワクチン高橋株の reverse genetics 法の確立

中山 哲夫、坂田 真史（北里生命科学研究所ウイルス感染制御 I）

駒瀬 勝啓（国立感染症研究所ウイルス第三部第二室）

【目的】弱毒風疹生ワクチン高橋株は 1960 年代後半に我が国で分離された野生株をウサギ辜丸細胞、ウサギ腎細胞で継代し低温馴化株を樹立し生ワクチンとして製造している。弱毒のマーカ―としての生物学的性状に関与する遺伝子を解析し、高温で増殖しない ts の性状を規定する遺伝子を特定することを目標とした。こうした解析には感染性 cDNA クロ―ンを作製し組換えウイルスを回収する reverse genetics の system を確立する必要がある。

【方法】弱毒風疹生ワクチン高橋株のワクチンシードから genome RNA を抽出し RT-PCR で 6 フラグメントに分割し pUC18 ベクターの multicloning site を利用し風疹ウイルス内に存在する制限酵素部位を利用し全長 9762 塩基を組み込んだプラスミドを構築した。遺伝子発現のプロモーターには T7、または SP6 プロモーターの下流に風疹ウイルス遺伝子を配した。reverse genetics 法により作製するウイルスの遺伝子マーカ―としてアミノ酸変異を起こさないように 9647 位の遺伝子 T→A に置換し組換えウイルスの遺伝子マーカ―とした。in vitro RNA を合成し Vero 細胞に transfection した。風疹ウイルス感染価の測定は Vero 細胞単層培養に plaque 形成法で算出した。

【結果】

1) ワクチンシードウイルスから RT-PCR で 6 フラグメントを増幅し Nde I, Nhe I, Bgl II, Asc I, Pst I の制限酵素部位を利用し全長 cDNA を構築し pUC18 multicloning site の Hind III, Eco RI にクローニングした。T7, SP6 プロモーター配列を付加し 9647 位の T と A に置換した (図 1)。In vitro RNA 合成し作製した RNA を電気泳動し構築したサイズの RNA が合成されていることを確認した (図 1)。

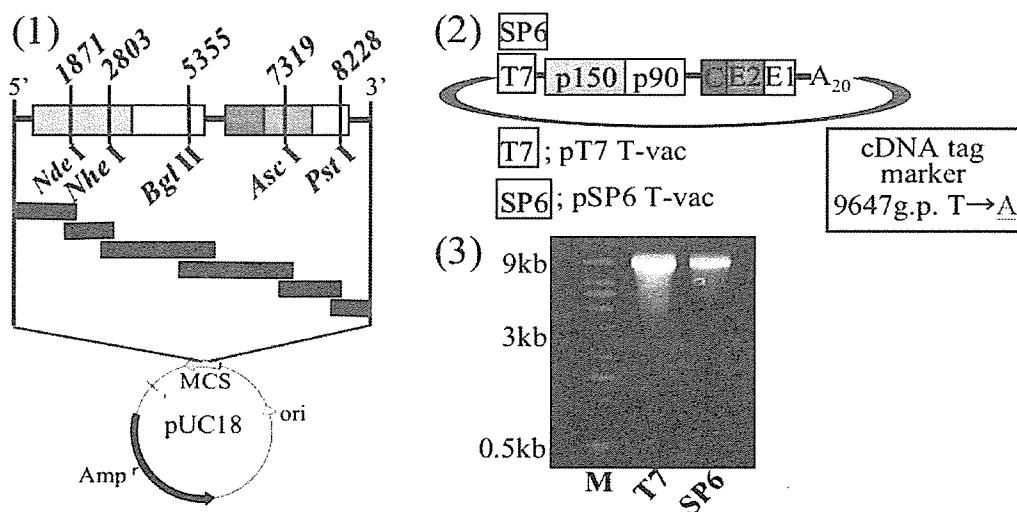


図 1 風疹ウイルス感染性 cDNA の構築

2) 合成した RNA を Vero 細胞、RK13 細胞に transfection し経時的に培養上清中のウイルス量を測定した。24 時間後には感染性ウイルスが検出され RK13 細胞では 48 時間後、Vero 細胞では 96 時間後にはピークに達しその後は変化がなかった。ウ

ウイルス回収効率は Vero 細胞の方が RK13 細胞と比較して約 10 倍程度高い事が明らかとなった (図 2)。

- 3) 回収されたウイルスの遺伝子を解析し 9647 位の遺伝子は A で、高橋ワクチン株は T であった (図 3)。組換え風疹ウイルスの tag 遺伝子マーカーとして導入した変異をもっているウイルスを回収できた。導入した変異により新たな Sph I 制限酵素部位ができる事になり高橋ワクチン株では切断できないが組換えウイルスの RT-PCR 産物は Sph I で切断された。
- 4) 1960 年代後半に分離された風疹野生株と遺伝子配列の違いを検討した。構成蛋白遺伝子領域 C 蛋白領域で 4 アミノ酸、E2 蛋白で 8 カ所、E1 蛋白で 5 アミノ酸の差を認めた。非構成蛋白 p150 では 15 アミノ酸、p90 には 1 カ所のアミノ酸に変異を認めた。

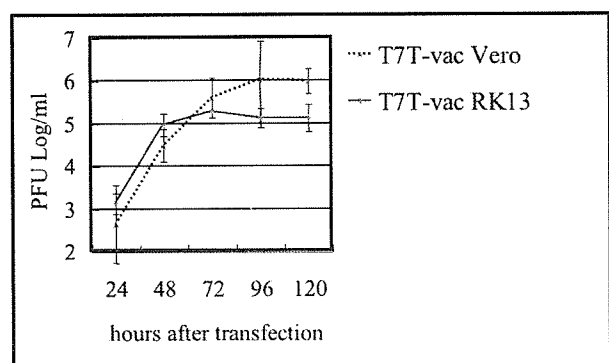


図 2 感染性ウイルスの回収

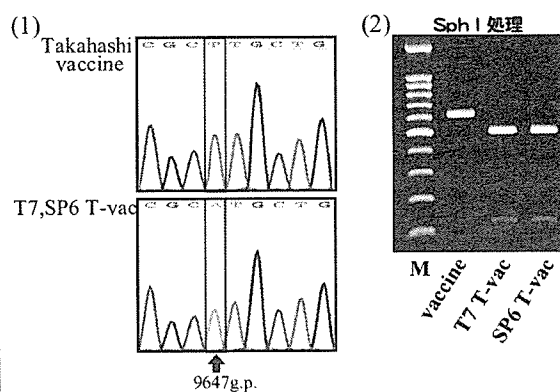


図 3 回収したウイルスの遺伝子

まとめ

感染性 cDNA から in vitro RNA 合成し RNA transfection を行い、風疹ウイルスを回収する Reverse genetics の手法を確立した。風疹高橋株は北里研究所で樹立した風疹ワクチン株で温度感受性のマーカーを有しており、ts の性状を規定する遺伝子領域の決定にこのシステムを利用し解析を進めている。

母乳中に含まれる風疹ウイルス抗体に関する研究—第1報—

牛島 廣治（東京大学大学院医学系研究科発達医科学）

早川 有子（群馬パース大学保健科学部）

横田 桂昌（横田マタニティホスピタル）

村上 正巳（群馬大学大学院医学系研究科病態検査）

背景

1. 風疹抗体保有率が低い世代の女性が、現在妊娠可能な年齢を迎え、先天性風疹症候群（CRS）児の出生が増加することが懸念されている。
2. 平成 16 年に CRS が 10 例発症し厚生労働省が「風疹流行及び先天性風疹症候群の発生予防に対する緊急提案」を作成した。
3. 母乳中の風疹 IgA 抗体に関する研究はこれまでにない。

目的

1. 母乳（初・成）中に風疹 IgA 抗体がどの程度含まれているかを明らかにする。
2. 母乳（初・成）中の風疹 IgA 抗体と総 IgA 量、総蛋白量との関係を明らかにする。
3. 母乳（初・成）中風疹 IgA 抗体と妊娠中の血清中風疹抗体価（HI 法）との関係を明らかにする。
4. 妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往歴および予防接種歴との関係を明らかにする。

研究方法

1. 母乳中の総蛋白、総 IgA、風疹 IgA 抗体の測定
 - ① 総蛋白測定法：BNII システム（比濁法）
 - ② IgA 定量測定法：BNII システム（免疫比ろう法）
 - ③ 風疹 IgA 抗体測定法：間接酵素抗体法
2. 質問紙によるアンケート調査
 - ① 母親の風疹予防接種の有無
 - ② 母親の風疹罹患の有無
 - ③ 児の母乳栄養の状況等 16 項目からなる統計的解析は SPSS Ver.11 を用いて行った

対象

1. 血清中の風疹抗体値（HI 法）が既知で、初乳・成乳共に採取できた 205 名
2. 年齢：17 歳～43 歳 平均 30 歳±4.5 歳
3. 初・経産婦の数：初産婦 106 名（51.7%）経産婦 99 名（48.3%）

結 果

1. 風疹の予防接種と罹患の有無

風疹の予防接種と罹患	人数 (%)			
	ある	ない	不 明	無回答
風疹の予防接種の有無	86(42.0)	30(14.6)	75(36.6)	14(6.8)
風疹罹患の有無	91(44.4)	49(23.9)	53(25.9)	12(5.8)

予防接種あるが多いが、不明の割合も多かった。風疹罹患についても不明が多かった。表にはないが未接種者での罹患が接種者での罹患より多かった。

2. 母乳(初・成)中の総IgA、総蛋白、風疹IgA抗体

初乳では

測定項目 単位	総IgA (mg/dl)	総蛋白 (mg/dl)	風疹IgA (OD)
検体数	203	204	204
最大値	2300	4640	2.153
最小値	14.4	143	0.00
平均値	242.4	1205	0.17
標準偏差	275.5	949.4	0.250

成乳では

測定項目 単位	総IgA (mg/dl)	総蛋白 (mg/dl)	風疹IgA (OD)
検体数	201	201	201
最大値	474	5620	1.638
最小値	3.4	84.4	0.00
平均値	45.9	893	0.062
標準偏差	68.1	652.9	0.160

初乳中に総IgA,総蛋白、風疹IgAが多かった。

3. 母乳中の総IgA、風疹IgA、総蛋白との相関 (Spearman)

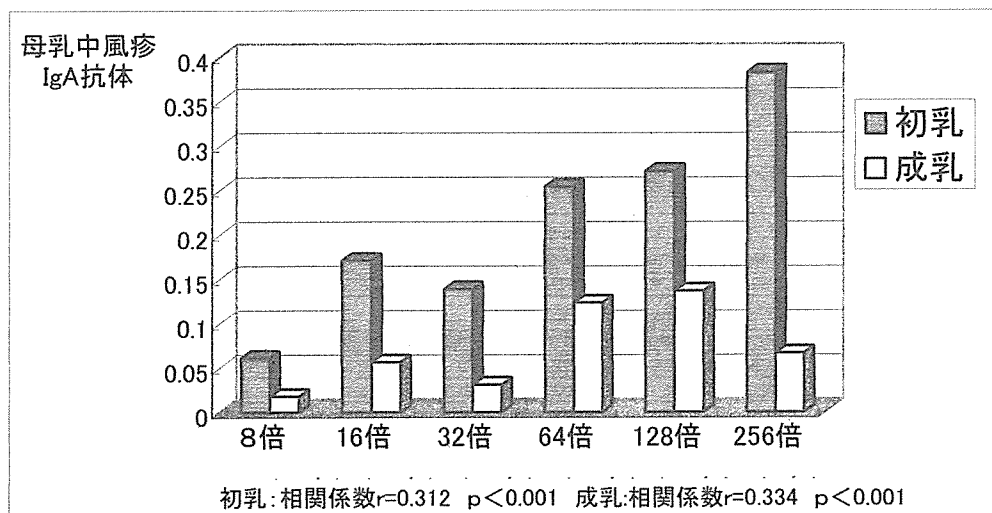
母乳中の総IgA、風疹IgA、総蛋白との関連をみると、風疹IgAは、初乳と成乳において正の相関がみられた ($r=0.636$)。また、母乳中の総IgAと風疹IgAとの間で正の相関傾向がみられた(初乳 $r=.275$ 成乳 $r=0.254$)。さらに、初乳中の風疹IgAと総蛋白においては正の相関がみられ ($r=0.055$)、成乳中の風疹IgAと総蛋白においては負の相関がみられた ($r=-0.77$)

測定項目	初・成乳別	相関係数 Spearman
総IgA	初乳	0.275***
	成乳	
風疹IgA	初乳	0.636***
	成乳	
総蛋白	初乳	0.055
	成乳	

*** p<0.001

4. 妊娠中の血清中風疹抗体値と母乳（初・成）中風疹 IgA 抗体

妊娠中の血清中風疹抗体値と母乳（初・成）中風疹 IgA 抗体においては、血清中の風疹抗体値（HI 法）では、8 倍未満が 42 名（20.5%）、16 倍が 46 名（22.4%）、32 倍が 54 名（26.3%）、64 倍が 39 名（19.0%）、128 倍が 19 名（9.3%）、256 倍が 5 名（2.4%）で、低抗体価（HI 抗体価 16 倍以下）が約 45%を占めた。



妊娠中の血清中風疹抗体値と母乳中の風疹抗体値においては、血清中風疹抗体値と母乳中の風疹抗体値の間に正の相関傾向がみられた（初乳 $r = 0.312$ 、成乳 $r = 0.334$ ）、

5. 妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往或いは予防接種歴

妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往或いは予防接種歴において、予防接種は有意確率 ($p = 0.089$)、罹患は有意確率 ($p = 0.196$) で、妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往或いは予防接種歴との関係はみられなかった。

考 察

母乳中の総 IgA、総蛋白、風疹 IgA は、成乳より初乳に高濃度に含まれていたこと。また、母乳中の風疹 IgA と総 IgA の間で正の相関傾向がみられたことから、母乳特に初乳を与える意義を風疹の視点からも考えられる。また、妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往、或は接種歴との関係がみられなかったことから、予防接種・罹患したことがそのまま、風疹の抗体価に反映するとはいえないことを考慮し、今後風疹対策を考えていく必要があると考える。

結 語

1. 総 IgA、総蛋白、風疹 IgA は、成乳より初乳に高濃度に含まれていた。
2. 風疹 IgA は、初乳と成乳の間で正の相関がみられた ($r = 0.636$)。
3. 母乳中の風疹 IgA と総 IgA の間で正の相関傾向がみられた
(初乳 $r = 0.275$ 成乳 $r = 0.254$)。
4. 妊娠中の風疹血清抗体値と母乳中の風疹抗体値で正の相関傾向がみられた
(初乳 $r = 0.312$ 成乳 $r = 0.334$)。
5. 妊娠中の血清風疹抗体と風疹の既往あるいは接種歴との関係はみられなかった。

おわりに

風疹 IgA の高い母親と低い母親とで同じくらい母乳を飲んだ時に児がどれくらい風疹 IgA の抗体を持ったかを定量化することが今後の課題と考える。

まとめ

母乳中の風疹 IgA 抗体を酵素抗体法で測定できた。初乳中がより高く見出され、初乳と成乳では正の相関が見られた。妊娠中の血清風疹抗体値と母乳中の抗体値は正の相関が見られた。妊娠中の血清風疹抗体値と風疹の既往あるいは接種歴とは関係は見られなかった。母乳の風疹に対する中和抗体についてはこれから検討する予定である。母乳の風疹予防については臨床を含めて今後検討する。

風疹ウイルスのゲノタイプ間のコドン・シケーンズ解析の比較

牛島 廣治、沖津 祥子（東京大学大学院医学系研究科発達医科学）

周 玉梅、Frey TK（ジョージア州立大学生物学教室）

はじめに

風疹ウイルスはヒトの急性発疹性疾患の重要な1つの感染症で、特に妊娠初期に感染すると先天性風疹症候群を来す。風疹ウイルスは、エンベロープを有する1本鎖(+) RNAウイルスである。トガウイルス科のルビウイルス属に属する。約10 kbの遺伝子配列で2つのORF、3つのUTR、5末端はキャップ構造を持つ、3末端はpolyAからなる。E1領域およびSP-ORF領域の配列から風疹ウイルスは2つのCladeに、さらに10のゲノタイプに分けられる。

これらにはコドンの同義置換、非同義置換がある。そして進化的な方向に進んでいくがランダムに起きるわけではない。幾つかの選択の理論がある。風疹ウイルスにはGCの多い領域がある。GCが多いことがコドン使用にどう影響しているか答えるために、8ゲノタイプの中で13ゲノムについて調べた。ここでは塩基組成とサブゲノムあるいはゲノムのコドン使用について調べた。

材料と方法

風疹ウイルスの遺伝子解析

今までの研究から19の全塩基配列を得た。10ゲノタイプの中の8つのゲノタイプにあたる。13ウイルスはClade Iに、6つのClade IIである。13の部位を解析した。GCGパッケージのpileupプログラムを用い、Clustal W softwareで解析した。

コドンの解析

コドン利用の偏りを見るため2つのパラメタ、相対的同義コドン利用(RACU)とeffective number of codon (Nc)を用いた。1.0 RSCU値近いのは偏りなく使われていることを示す。またNc値は20(一つのコドンが1つのアミノ酸とする偏りが最も強い)から61のすべてのコドンが平均して用いられる偏りのないまでにわたっている。さらに5つの指標、同義置換でコドンの第三番目がGC(GまたはC)を有する(GC3s)、コドンの第3番目をアミノ酸組成を換えないで最大限に核酸を平等に使用するA3s,C3s,G3s,T3s(総称するとN3s)を利用した。コドン使用頻度、RSCUパラメータはDAMBEソフトウェアを用いた。A3s,T3s,C3s,G3s,GC3sとNcパラメータはCodonW win3.2を用いて表示した。コドン部位あるいは全コドンシケーンズの中の塩基組成はTREE-PUZZLE 5.2を用いて表示した。NcとGC3sおよびNcとGC3s plotの回帰直線はWindow XPのMicrosoft Excelを用いた。

結果と考察

- ・ 風疹のことなるゲノタイプにおいて塩基組成、塩基使用の有意な差は見られなかった。
- ・ 風疹のゲノムの塩基およびコドン利用は非ランダムで有意な偏りがあった。HVR を除くと CG で末端が終わる、特に C で終わるコドンが多く見られた。しかし、コドンの第一、第二番目の部位は GC の傾向は見られなかった。
- ・ HVR の GC 利用は他の部位とは異なっており、コドンの第一と第二番目の部分に GC の利用が多く、第三の部分には少なかった。
- ・ 風疹ウイルスと宿主のゲノムの GC 含有を概観すると GC は第 3 番目 > 第 1 番目 > 第 2 番目の順であった。このことはウイルスが宿主の機能を積極的に使用しようとする現われと思われた。
- ・ HVR を除くと、Nc と GC3s は負の関係が見られ、特に C3s と関係していた。実測 Nc-plot を予測 Nc-plot と比較すると多くの遺伝子は予測 Nc-plot の曲線のすぐ下にあった。HVR では他の部位と異なってもっと上にある。多くの部位は GC に拘束され HVR では他の要因（自然淘汰）によって拘束されているようであった。

要旨

風疹ウイルス 8 ゲノタイプ中の 13 のゲノムにおいて塩基およびコドンの使用パターンの解析をした。ゲノムは GC が多いウイルスであり、部位によってはその割合が異なる。HVR (hyper variable region) の GC 含有はコドンの第一および第二番目が高く、第三番目では低い。しかし全体的には GC はコドンの第三目に一番多く、次に第一番目、そして第二番目に多く見られた。異なるゲノタイプで特にコドン使用に差がなかった。HVR を除くと非ランダムなコドン使用であり、C で終わるコドンが主であった。全体的に突然変異圧が関係付けられた。Effective number of codon (Nc) とコドン 3 番目の GC 含有 (特に C) とは負の相関が見られた。実測 Nc plot と予測 Nc plot とは同様の突然変異圧を持っていた。しかし HVR では違っているようであった。

表 2. Base composition (%) of subgenomic genes and regions of RV and base composition of host gene of RV (human) on codon positions and overall coding sequences.

Codon position	Gene	A	C	G	T	Codon position	Gene	A	C	G	T
1st	NSP	15.4	31.5	40.6	12.5	3rd	NSP	6.9	53.4	29.1	10.6
	P150	13.3	33.1	40.7	12.9		P150	7.5	52.2	30.1	10.2
	MT	18.1	36.8	36.2	8.9		MT	13.7	48.7	26.2	11.4
	HVR	8.7	43.2	41.4	6.7		HVR	9.1	47	34.4	9.6
	XD	12.3	30.2	46.8	10.7		XD	5.4	56.7	28.4	9.4
	NP	14	32.6	39	14.4		NP	6.5	55.3	28.8	9.4
	P90	18.7	29	40.3	12		P90	6	55.3	27.5	11.2
	HEL	19.8	28.2	38.4	13.6		HEL	7.2	60.9	21.4	10.5
	RDRP	18.9	29.8	40	11.3		RDRP	5.7	52.5	29.8	12
	SP	15.8	33.2	35.5	15.6		SP	6.8	51.4	28.8	13
	C	14	39.4	35.6	11.1		C	7.5	50.7	30.3	11.4
	E2	14.7	36.9	33.1	15.2		E2	4.8	54.5	28.3	12.4
	E1	17.4	27.1	36.8	18.6		E1	7.6	50.1	28.1	14.3
	Ave.	15.5	33.2	38.8	12.6		Ave.	7.3	53.0	28.6	11.2
Human	28	23	31	18	Human	17	34	29	20		
2nd	NSP	22.7	30.8	24.6	22	All	NSP	15	38.6	31.4	15
	P150	20.5	32.8	26.2	20.4		P150	13.8	39.4	32.4	14.5
	MT	22.9	28.6	25.7	22.9		MT	18.2	38	29.4	14.4
	HVR	15.1	56.9	20.5	7.6		HVR	11	49	32.1	8
	XD	16.8	35.6	24.8	22.8		XD	11.5	40.8	33.4	14.3
	NP	20	31.3	31.3	17.4		NP	13.5	39.7	33	13.7
	P90	26.1	27.6	21.9	24.4		P90	16.9	37.3	29.9	15.9
	HEL	26.3	26.9	24.5	22.3		HEL	17.8	38.7	28.1	15.5
	RDRP	25.9	27.7	20.7	25.7		RDRP	16.8	36.7	30.2	16.3
	SP	21.8	33	26	19.3		SP	14.8	39.2	30.1	15.9
	C	22.1	34.9	27.3	15.6		C	14.6	41.7	31.1	12.7
	E2	19.9	33	27.2	19.9		E2	13.1	41.5	29.5	15.8
	E1	22.6	31.8	24.4	21.1		E1	15.9	36.4	29.8	18
	Ave.	21.7	33.1	25.0	20.1		Ave.	14.8	39.8	30.8	14.6
Human	32	22	18	28	Human	25	26	26	22		

表 3. Base and codon usage indexes of subgenomic genes and regions of RV across nineteen genomes

Index Genes	T3s ave. stdv	C3s ave. stdv	A3s ave. stdv	G3s ave. stdv	Nc ave. stdv	GC3s ave. stdv	GC ave. stdv	L_sym	L_aa
NSP	0.123 0.005	0.617 0.006	0.088 0.005	0.336 0.005	37.686 0.605	0.818 0.007	0.700 0.002	2036-2033	2116
P150	0.117 0.005	0.595 0.005	0.095 0.006	0.341 0.006	38.965 0.538	0.815 0.008	0.717 0.002	1250-1247	1301
MT	0.135 0.029	0.578 0.026	0.165 0.012	0.279 0.015	35.287 2.106	0.738 0.026	0.674 0.008	67	70
HVR	0.101 0.016	0.496 0.014	0.102 0.012	0.390 0.016	40.754 4.947	0.813 0.018	0.811 0.010	107	107
XD	0.103 0.021	0.617 0.017	0.066 0.009	0.337 0.012	35.933 1.446	0.848 0.020	0.742 0.008	166-165	169
NP	0.107 0.014	0.629 0.013	0.085 0.014	0.316 0.014	37.972 1.232	0.833 0.020	0.728 0.007	287-285	300
P90	0.132 0.008	0.653 0.009	0.077 0.006	0.327 0.008	36.211 0.841	0.822 0.010	0.673 0.003	786	815
HEL	0.120 0.010	0.697 0.011	0.096 0.015	0.263 0.012	35.534 0.802	0.817 0.014	0.667 0.005	245-244	252
RDRP	0.144 0.011	0.632 0.013	0.073 0.014	0.348 0.014	36.802 1.335	0.816 0.017	0.668 0.005	501-500	521
SP	0.150 0.008	0.594 0.008	0.089 0.005	0.325 0.007	40.409 0.756	0.793 0.009	0.693 0.003	1019-1017	1063
C	0.136 0.013	0.602 0.013	0.091 0.012	0.321 0.010	38.475 1.530	0.802 0.013	0.727 0.004	288-287	300
E2	0.138 0.013	0.607 0.017	0.066 0.008	0.322 0.009	39.674 1.922	0.819 0.014	0.710 0.007	268-066	282
E1	0.165 0.015	0.580 0.015	0.100 0.008	0.329 0.010	42.282 1.185	0.773 0.015	0.662 0.004	463-462	481

图 1. Graphs showing the relationship between the effective number of codon (Nc) and the GC content at the third synonymous codon position (GC3s) of each genes and regions. Liner regression analysis showed, with exception of HVR, Nc is strongly negatively related with GC3s.

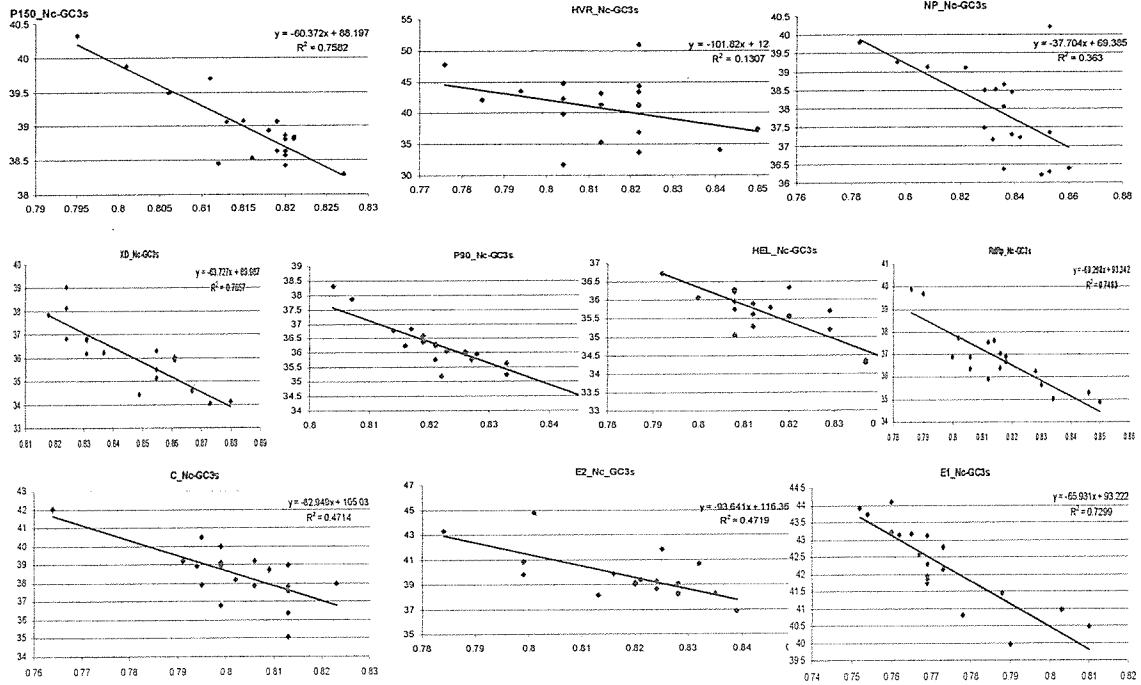


表 2. Graphs showing the relationship between the effective number of codons (Nc) and the G- or C- usage at the third synonymous codon position (G3s and C3s). Liner regression analysis indicated Nc index is more strongly negatively related with C3s than that of G3s (only p150, p90 and SP gene shown in here as a representative), but no difference is found at HVR.

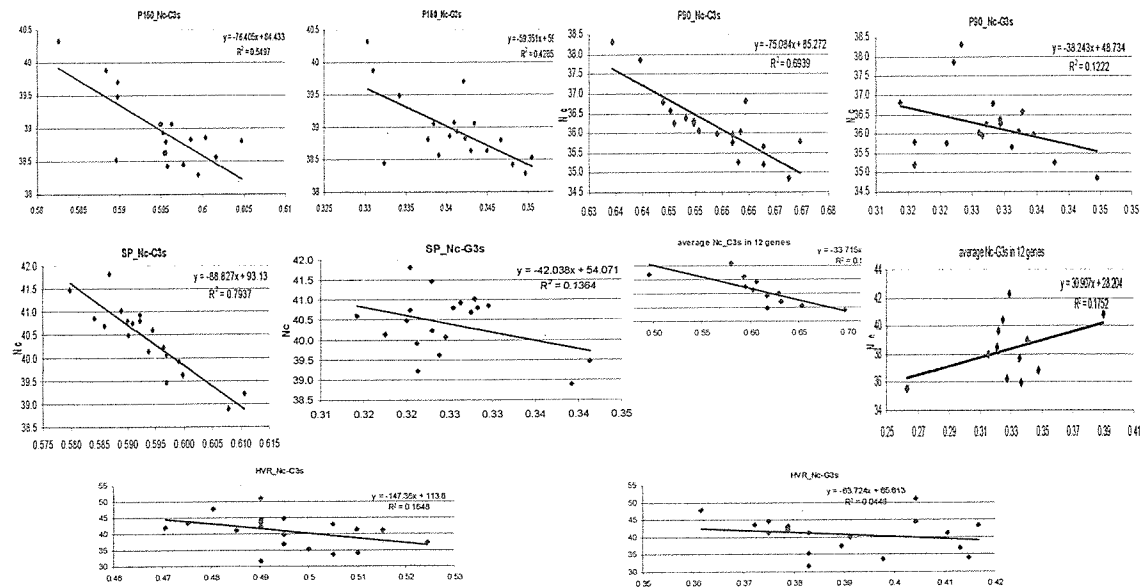
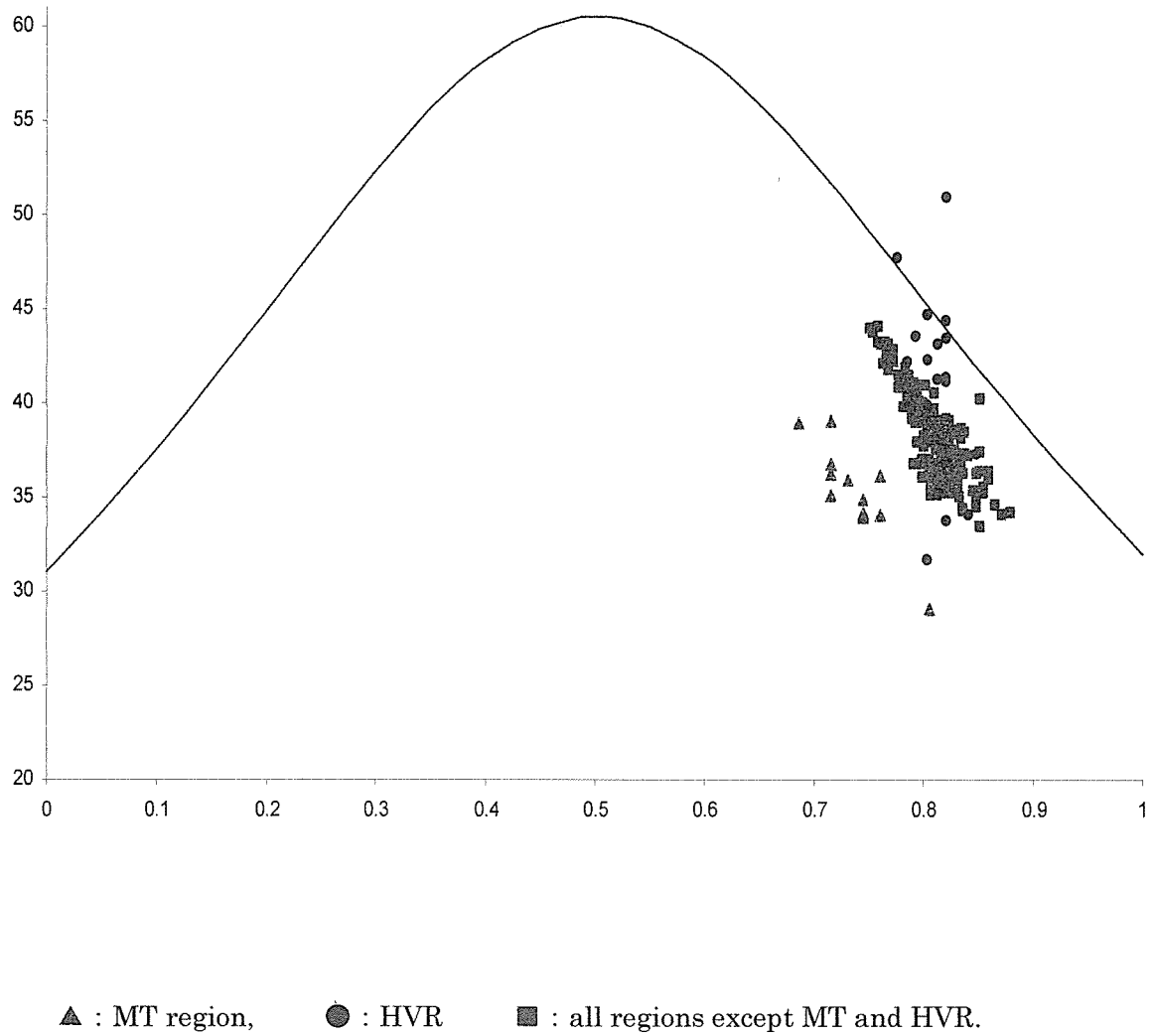


Fig 3. N_c versus GC3s plot of RV subgenomic genes and regions. The curve indicates the expected codon usage if GC compositional constraints were the only factor influencing codon usage bias.



ムンプスウイルス、おたふくかぜ生ワクチンの神経病原性評価

加藤 篤、木所 稔、田代 真人（国立感染症研究所ウイルス第三部）

【背景と目的】

流行性耳下腺炎、通称おたふくかぜは、耳下腺の腫脹、発熱や全身倦怠感、食欲不振、頭痛などを特徴とするムンプスウイルスによる感染症である。ムンプスウイルスの自然宿主はヒト以外に存在せず、本疾病が弱毒生おたふくかぜワクチンにより予防が可能であり、克つワクチンの費用対効果比がよいことから WHO は本疾病をワクチンを利用して撲滅できる疾病としてリストしている。ところが、我が国のワクチン摂取率は 20%以下であり、4 年に一度の全国規模の流行を今も繰り返している。

わが国のおたふくかぜワクチンは 1981 年に初めて弱毒生ワクチンとして出荷され、1989 年 4 月から麻疹、風疹ワクチンと混合して MMR ワクチンとして定期接種されたが、ワクチンの副反応としての無菌性髄膜炎の発生頻度が無視できないレベル(約 1000 人 1 人)に達したために 1993 年、開始後わずか 4 年で定期接種は中止され、現在は単味ワクチンとして任意接種される方式に変わった。これが本ワクチンの接種率が低い理由である。そこで、本研究ではムンプスウイルスの神経病原性を評価できる系を比較検討し、無菌性髄膜炎発生頻度の低いワクチンの開発、あるいは既存ワクチンの安全性評価に役立てることを目的とした。

現在までに、我々は Rubin ら(米, FDA)による乳飲み rat の脳内接種モデル(*J. Virol.*, 72:8037-8042, 1998, *ibid* 74:5382-5384, 2000)の検証を行い、その結果を再現できた(表 1)。この系では、接種後 3~9 日目でのムンプスウイルスの脳内細胞での増殖率の差とその後の水頭症発症の程度がよく相関しており、神経細胞での増殖性を指標に培養細胞レベルでも評価できる可能性を示唆している。昨年、Reyes-Leyva らは、病原性の異なるムンプスウイルス Urabe 株 variant のヒト神経芽腫由来細胞 SH-SY5Y の増殖性が、ヒトでの神経病原性の程度と相関する (*Microbes Infect.* 8:332-339, 2006)ことを発表した。そこで、今年度はこの SH-SY5Y 細胞を使って、培養細胞レベルでムンプスウイルス株のヒト神経病原性の評価が可能かどうかを検証した。

表1 ムンプスウイルス各株のヒトと Lewisラットでの神経病原性

	野外株	国産ワクチン株	海外ワクチン株
	Odate	Urabe M3	Jeryl-Lynn
ヒトでの無菌性髄膜炎発症頻度	73%(14/19) ¹⁾	0.15% ²⁾	0.00001% ³⁾
Lewisラットでの神経病変発生頻度	75%(3/4)	37.5%(3/8)	0%(0/11)

1)高橋義博ら、臨床とウイルス 24:305-310, 1996

2)木村三生夫ら、臨床とウイルス 23:314-340, 1995

3)Merck社資料による

【材料と方法】

<細胞及びウイルス> ATCC よりヒト神経芽腫由来細胞株 SH-SY5Y 細胞 (CRL-2266)を購入し、MEM 培地に 10%牛胎児血清、1%アミノ酸強化液を加えて培養を行った。ムンプスウイルスとしてワクチン株である Urabe 株(lot M3)と Jeryl-Lynn 株、野外株である Odate 株を用いた。

<ウイルス感染> SH-SY5Y 細胞を 6 well plate に蒔き、細胞密度が 70% (1×10^6 cells/well) になったときに、1 well あたり 1×10^4 pfu のムンプスウイルスを感染させた (0.01 pfu/cell)。1 時間の吸着の後、ウイルス液を除き、SFM(インビトロジェン)培地で 2 回洗った後に、1 ml の SFM 培地を加え 72 時間培養した。細胞とウイルスを 0、

24、48、72 時間後に回収し、遠心した上清液を用いてウイルス力価測定とウイルスゲノムの RT-PCR 検出及び copy 数測定に用いた。遠心した沈殿物を細胞成分として SDS-PAGE 後、抗ムンプスウイルス兔血清によりイムノプロット解析を行った。

<定量的 PCR> ウイルスゲノムの copy 数測定には TaqMan PCR 装置を使った。MuVN-350F: ATGCACGCGCCAATCTTAC、MuVN-418R:TTGGGAGGTCGTCTGC 及び、MuVN-371T: ^{FAM}-CCAATGAAATTGCTGCCTATGCTTTGCT-^{TAMRA} をもちいて、qPCRTM (和光純薬 : 3130-80221)により反応を行った。

<ウイルス力価> ウイルス力価は常法に従って Vero 細胞を用いた CCID₅₀ 法(TCID₅₀)あるいはブラック法(pfu)によって測定した。

【結果】

ウイルスブラックの性状

今回の試験には、ヒトでの無菌性髄膜炎の発生頻度の異なる3つの株；野外 Odate 株、国産ワクチン Urabe(lot M3)株(以下は Urabe M3 株)、海外ワクチン Jeryl-Lynn 株を用いた。

これらの株は、乳飲みラットの水頭

症発生率にも差が認められる事が分かっている(表 1)。野外株 Odate 株は Vero 細胞で非常に大きく、縁辺部の形状のはっきりとしたブラックを形成した。一方、Urabe M3 株は、明瞭であるものの野外株に比べれば小さなブラックを形成した。この条件下で Jeryl-Lynn 株は、野外株よりはやや小さいが、国産ワクチンに比べて大きく、克つ縁辺部のはっきりしたブラックを形成した。Vero 細胞によるブラックサイズや形は、Vero 細胞に対する各株の細胞傷害性とは関連するもののヒトやラットでの神経病原性性の程度(表 1)と何ら相関していなかった(図 1)。

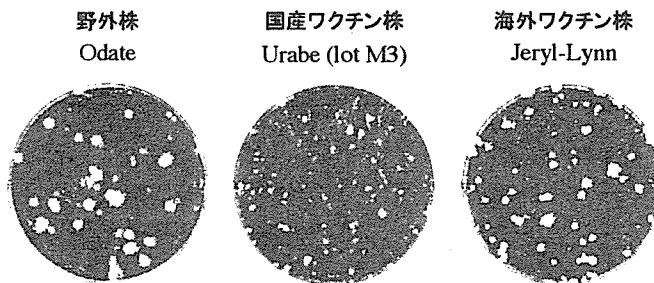


図1. ムンプスウイルスのブラック

ヒト神経芽腫由来 SH-SY5Y 細胞

Reyes-Leyva らの報告に従って SH-SY5Y 細胞を準備した(図 2)。細胞は突起上ものを周囲に伸ばしているが、細胞は培養液基底面から容易に剥がれししまうことから、突起物は細胞と容器の接着にはほとんど役立っていないように思われた。この細胞を用いてムンプスウイルスの増殖性に差があるのか否かを検証した。髄膜炎発生頻度の異なるムンプスウイルス Odate 株、Urabe M3 株、Jeryl-Lynn 株を細胞あたりの感染価 0.01 で感染させて3日間培養した。24 時間毎に採取し培養上清中にウイルスが入るか否かをムンプスウイルス SH 遺伝子部分を RT-PCR で増幅した(図 3)。その結果、いずれ

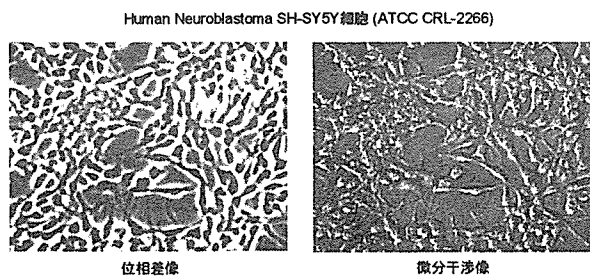


図2. SH-SY5Y細胞像

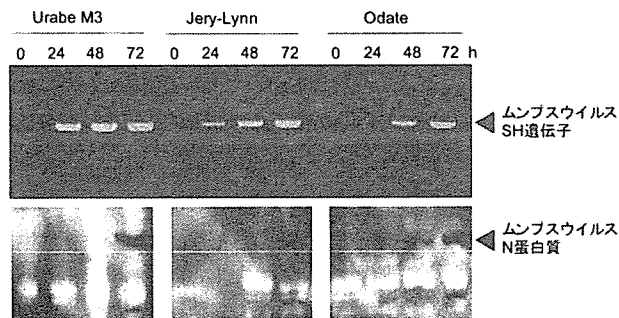


図3. SH-SY5Y細胞でのムンプスウイルスの増殖

表2. SH-SY5Y細胞での神経病原性の異なるムンプスウイルスの増殖

	ウイルス力価 10^6 TCID ₅₀ /ml			ウイルスゲノム 10^6 copy/ml		
	Urabe M3	Jeryl-Lynn	Odate	Urabe M3	Jeryl-Lynn	Odate
0	<2.0	<2.0	<2.0	0	<3.0	<3.0
24	<2.0	<2.0	<2.0	24	5.00	4.60
48	3.50	2.87	2.75	48	5.95	5.27
72	4.62	3.75	3.50	72	5.93	6.09

のウイルス株も感染後24時間から増幅バンドが検出され、SH-SY5Y細胞でのウイルス増殖が確認された。一方、感染細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗ムンプスウイルス兔血清でイムプロットしたところ、こちらは72時間でどのウイルス感染細胞もN蛋白質のバンドが検出された。N蛋白質のバンドの濃さは、Jeryl-Lynn株が多株に比べて薄く、ウイルスの増殖性に差があることが疑われた。

ヒト神経芽腫細胞でのムンプスウイルスの増殖性

培養上清中のウイルス量とウイルスゲノムのcopy数をそれぞれ測定した(表2)。上清中のウイルスは、感染後48時間と72時間目に測定でき、その他は測定限界以下であった。Urabe M3株の増殖性が他の2株より優れており72時間の段階で10倍程高い値を示した(図4)。一方、上清中のウイルスゲノムのcopy数は、RT-PCRの結果と同様に感染後24時間より検出され、24時間と48時間の時点でUrabe M3株が他の2株より多くのゲノムが産生されていた。しかし、48時間の時点でcopy数は 10^6 copy/ml程度で頭打ちになり、72時間の時点では3株間に差は認められなかった(図4)。すなわち、ヒトの無菌性髄膜炎の発症頻度が異なるムンプスウイルスをヒト神経芽腫細胞SH-SY5Y細胞で増殖させたが、最も神経病原性の高いOdate株ともっとも低いJeryl-Lynn株の間に、有意差が認められず、Urabe M3株がこの3株の中では最も増殖性がよいという結果になった。

【考察】

現在、国産のおたふくかぜ生ワクチン3株が出荷されており、いずれもB遺伝子型に属している。世界で最もよく使われているJeryl-Lynn株は、A遺伝子型である。ワクチンの有効性という点では、わが国のワクチンは、前回の2000年~2002年に全国規模で流行したG遺伝子型株、K遺伝子型に属する新しい株に対しても機能することが知られている。2005年から始まった今回の流行も今の所G遺伝子型の株が主体であり、現行の国産ワクチンで対処できるものと予想される。しかし、世界的に見れば、2004年~2005年にかけて英国でG遺伝子型ムンプスウイルスの流行があり、7万5千人の患者がでていた。この中にはJeryl-Lynn株を含むムンプスウイルスワクチンを接種しているにもかかわらずおたふくに罹患した15~24才の患者が含まれていた。また、ワクチンの2回接種が徹底している米国においてもさへ2006年アイオワ州を中心に約4300人のG遺伝子型ムンプスウイルスによる流行が起きた。この多くはワクチンを接種して

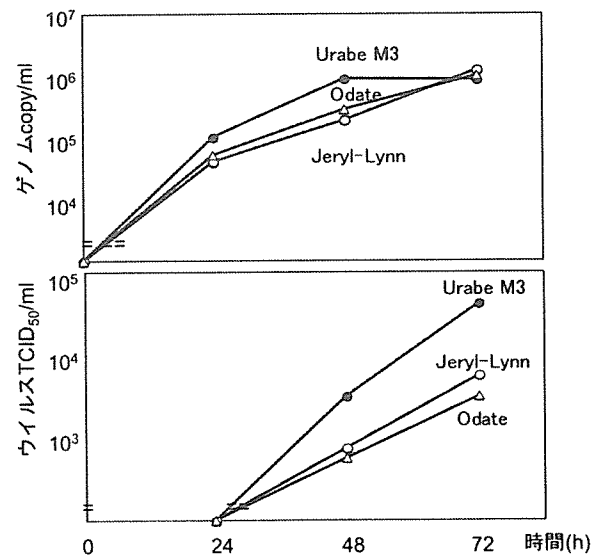


図4. SH-SY5Y細胞でのムンプスウイルスの増殖

いても罹患した青年層であった。Jeryl-Lynn 株による免疫では、G 遺伝子型の新型株に対してはもはや従来ほど有効期間が長くないと理解される。

国産おたふくかぜワクチンは、海外の Jeryl-Lynn 株ワクチンに比べて副反応としての無菌性髄膜炎の発生率が高く(表 1)、ワクチンの接種率を向上させるための障害となっている。Jeryl-Lynn 株の安全性は高いが、G 遺伝子型野外株の登場により今後も有効なワクチンとし使い続けられるかどうか慎重に考えなければならない時期に来ている。よりよいおたふくかぜ生ワクチンが求められる土壌はあるが、その病原性を評価する系が確立されていないことが開発にあたっての大きなリスクとなっている。

ワクチンの安全性を評価する品質管理試験の一つとして既にカニクイサルを用いた神経病原性試験が行われているが、とてもヒトでの発生頻度が 0.1%程度の神経病原性を定量的に検出できるほど鋭敏ではなく、ワクチン製造中に異常に病原性が向上した変異ウイルスが含まれていないことを示す程度の意味合いとして使われている。今後、新しいワクチンを開発するためにも、現行ワクチンの安全性確認のためにも、ヒトでの神経病原性を鋭敏に閏知する実験系が必要とされている。

ハムスターあるいはマウスを用いた脳内接種試験(McCarthy ら、*J. Med. Virol.*, 5:1-15, 1980)があるが、ハムスターの脳内接種試験成績を基に開発された国産ワクチンのヒトでの副反応発生率をみる限り、ヒトの神経病原性とハムスターの相関は低いと言わざるを得ない。その他、冒頭に紹介した乳飲みラット(Rubin ら、*J. Virol.*, 72:8037-8042, 1998, *ibid*, 74:5382-5384, 2000)とマーモセット(Saika ら、*J. Med. Virol.*, 66:115-122, 2002)を用いた試験があり、ある程度まではヒトとの相関性が認められる。しかし、rat 試験においては、ウイルス接種量と発症頻度の間の量効果が認められない事、マーモセット試験においてはまだ実施例が限られていることから、今後用いる野外株並びにワクチン株の数を増やしてヒトでの神経病原性と何処まで相関するのかを詳しく検証する必要がある。

本来ヒトのみを自然宿主とするウイルスを他動物で病原性を評価することには、それ自身矛盾を含んでいる。脳内の細胞での個々のウイルス株の増えやすさが、その後の病原性を発揮の度合いを決めているという仮説は魅力的である。そこで、ムンプスウイルスのヒト神経細胞で増殖性により病原性を評価できないかという考えが生じる。今回、我々は Reyes-Leyva ら (*Microbes Infect.* 8:332-339, 2006)の報告を契機として、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y を用いて Odate 株、Urabe M3 株、Jeryl-Lynn 株の増殖性を評価した。しかし、従来知られているヒトでの無菌性髄膜炎の頻度とウイルス増殖性の間には、なんら相関関係を見いだす事はできなかった。他のヒト細胞株での実験も必要だろう。

一般的に細胞傷害性の程度とウイルス増殖量の間には、必ずしも相関がなく、細胞傷害性が強くてもウイルスの増えは悪い場合、逆に細胞変性はほとんど起きていないのにウイルスがよく増えている場合もある。ムンプスウイルスの神経病原性が、脳内でのウイルス増殖量にほんとうに依存しているのかどうかを含めて検証が必要である。

【結語】

おたふくかぜ生ワクチンを普及させるためには、ワクチンの安全性と有効性をきちんとモニターしていく必要がある。なかでも神経病原性を鋭敏に測定できる優れた実験系を開発し、新しいワクチンの開発あるいは現行ワクチンの品質管理に応用することが強く求められている。

Respiratory Syncytial Virus (RSV) の F,G 蛋白を発現する 組み換え麻疹 AIK-C 株

中山 哲夫、藤野 元子（北里生命科学研究所ウイルス感染制御 I）

駒瀬 勝啓（国立感染症研究所ウイルス第三部第二室）

【目的】麻疹ワクチン AIK-C 株は Edmonstom 株を羊腎細胞で継代し低温馴化株を plaque cloning して樹立したワクチン株で、Vero 細胞に small plaque を誘導し、39-40°C の増殖は 33°C の 1 万分の 1 という温度感受性 (temperature sensitivity; ts) を有している。これらの生物学的性状に關与する遺伝子を解析し、Vero 細胞に small plaque を作る細胞融合能が低いことは F 蛋白 278 位のアミノ酸が Leu であること、高温で増殖しない ts の性状は P 蛋白 439 位の Pro が AIK-C の生物学的性状を担っていることを報告してきた。これらの性状はワクチン株弱毒化の一因であると考えられる。AIK-C 株は既に 2000 万ドース以上がヒトに接種されその有効性と安全性は担保されている。麻疹ウイルスは RNA ウイルスで遺伝子操作が困難であると言われてきたが全長 RNA を cDNA に変換し感染性ウイルスを回収する reverse genetics の技法が開発され、我々も AIK-C 麻疹ワクチン株をベースとした reverse genetics の技法を確立しワクチンデザインが可能となった。製造承認され広く使用され安全性が担保されている AIK-C 株を生ワクチンウイルスベクターとして、未だワクチンが開発されていないウイルス、現行ワクチンでは有効性・安全性に問題があるウイルスに対して、外来遺伝子を組み込んだ組換え麻疹ウイルスワクチンを作成する事を目的とした。本年度は、心疾患を基礎疾患として持つ乳幼児、未熟児、新生児に感染すると重症の肺炎を起し死亡の原因ともなる Respiratory syncytial virus (RSV) の G, F 蛋白を発現する組換え麻疹ワクチンを作成することを目的とした。

【方法】RSV 野外分離株の F, G 遺伝子領域を RT-PCR で増幅し linker 配列に Nco I, Not I 制限酵素配列を付加しクローニングした。AIK-C 全長 cDNA の P/M、junction に Asc I 制限酵素部位を導入しクローニングした RSVF、遺伝子を挿入したプラスミドを構築した（(図 1: pICMVAIK/RSV-G, pMVAIK/RSV-F)）。293T 細胞にキメラプラスミドと共に、T7 RNA polymerase を発現する組み換え Vaccinia virus を感染させ、麻疹ウイルス N, P, L 蛋白を発現する helper plasmids を co-transfection した。2 日後に麻疹ウイルスに感受性の高い B95a 細胞と co-culture を行い麻疹ウイルス特異的な CPE の出現を観察した。RSV ウイルス蛋白発現の確認は抗 RSV polyclonal 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

【結果】

- 1) 構築した pICMVAIK/RSV-G、pICMVAIK/RSV-F から感染性ウイルス MVAIK-/RSV-G、MVAIK/RSV-F を回収出来た。
- 2) 回収されたウイルスを B95a 細胞に感染させ麻疹ウイルス N 蛋白に対する monoclonal 抗体で染色する事で麻疹ウイルス N 蛋白の発現を確信した。RSV polyclonal 抗体で RSV 抗原の発現を確認できた
- 3) MVAIK-/RSV-G は B95a 細胞、Vero 細胞に感染させると培養上清中に感染性ウイルスを産生することが明らかとなった。一方、MVAIK/RSV-F はいずれの細胞に感染させても、cell association の傾向が強く、培養上清中には cell free 感染性ウイルス粒子の産生は極めて低い事が明らかとなった。